

BEST AVAILABLE COPY

51457-2001600-10361

Select CR

DELPHION

Log Out | **Work Files** | **Saved Searches**

RESEARCH | PRODUCTS | **INSIDE DELPHION**

My Account | Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#) Tools: Add to Work File:  Add

View: Jump to:  Go to: [Derwent](#) ☒ Email this to a friend

Title: CN1322843A: INTRACELLULAR NUCLEIC ACID TESTING METHOD AND DEVICE

Derwent Title: Intracellular nucleic acid testing method and device [\[Derwent Record\]](#)

- Country: CN China
  - Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection i
  - Inventor: XUEJUN ZHU; China
  - Assignee: ZHU XUEJUN China
- [News, Profiles, Stocks and More about this company](#)



Published / Filed: 2001-11-21 / 2000-05-05

Application Number: CN20000000108273

IPC Code: IPC-7: C12Q 1/68;

ECLA Code: None

Priority Number: 2000-05-05 CN20000000108273

Abstract: Intracellular nucleic acid testing process includes the following steps: providing labeled specific nucleic acid probe; fixing cell to be tested and exposing the nucleic acid to be tested; hybridizing specific nucleic acid probe and fixed suspending cell; washing out uncombined nucleic acid probe; fluorescent cascade amplifying label carried by the nucleic acid probe hybridizing combined with intracellular nucleic acid, and testing the fluorescence with flow cytometer to obtain test result. The method may be used in qualitative, quantitative, timing test of intracellular nucleic acid level through combining with cell type, and is especially suitable for multiple-probe and multichannel analysis. The present invention

also provides the device for the method.

INPADOC  
Legal Status:

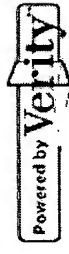
None      Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1322843A	2001-11-21	2000-05-05	INTRACELLULAR NUCLEIC ACID TESTING METHOD AND DEVICE
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1204267C	2005-06-01	2000-05-05	Intracellular nucleic acid testing method and device
2 family members shown above				

Other Abstract  
Info:

None



Nominate this for the Gallery...

BEST AVAILABLE COPY

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00108273.6

[43]公开日 2001 年 11 月 21 日

[11]公开号 CN 1322843A

[22]申请日 2000.5.5 [21]申请号 00108273.6  
[71]申请人 朱学军  
地址 210002 江苏省南京军区总医院肾脏病研究所  
[72]发明人 朱学军

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所  
代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 一种检测细胞内核酸的方法和装置

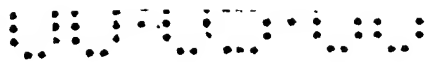
[57]摘要

本发明提供了一种新的检测细胞内核酸(如 DNA、mRNA)的方法,它包括步骤:(a) 提供带有标记的特异性核酸探针;(b) 固定待检测的细胞,并使待检测细胞内的核酸暴露;(c) 将特异性的核酸探针与经固定的悬浮细胞的核酸杂交;(d) 洗涤掉未结合的核酸探针;(e) 对与细胞内核酸杂交结合的核酸探针所携带的标记进行荧光级联放大;(f) 用流式细胞仪对荧光进行检测,获得测量结果。本发明方法可定性、定量、定时、并结合细胞类型检测细胞内的核酸水平而且尤其适用于多探针及多通道分析。本发明还提供了用于该方法的装置。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权利要求书

- 1.一种检测细胞内核酸的方法，其特征在于，它包括步骤：
  - (a)提供带有标记的特异性核酸探针；
  - (b)固定待检测的细胞，并使待检测细胞内的核酸暴露；
  - (c)将特异性的核酸探针与经固定的悬浮细胞的核酸杂交；
  - (d)洗涤掉未结合的核酸探针；
  - (e)对与细胞内核酸杂交结合的核酸探针所携带的标记进行荧光级联放大；
  - (f)用流式细胞仪对荧光进行检测，获得测量结果。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该核酸探针所带的标记选自下组：  
地高辛、生物素、荧光素、辣根过氧化物酶。
- 3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括步骤：  
用带荧光素标记的抗细胞表面分子或细胞内分子的单克隆抗体，对细胞进行标记，以区分不同类型的细胞。
- 4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括步骤：  
将步骤(f)中测量结果与参照物的测量结果进行比较，或者与标准曲线进行比较，从而得出定量结果。
- 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括：  
在步骤(c)之前，进行预杂交以减少非特异结合背景。
- 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括步骤(g)：对步骤(f)检测后的细胞进行流式细胞仪分选。
- 7.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的核酸包括：DNA、RNA、和 EST。
- 8.一种杂交洗涤装置，其特征在于，它包括：
  - 一多孔的微孔杂交板(200)，在板上有 4-10000 个杂交孔(210)，在微孔板底部上覆有玻璃纤维滤纸(202)；
  - 一上密封盖(100)，上密封盖(100)有一可引入杂交洗涤液的开口(110)；
  - 一输液针板(101)，它具有多个位置与微孔杂交板上杂交孔(210)相对应的输液针(102)，输液针的下部具有密封垫圈(103)；
  - 一下密封盖(300)，下密封盖(300)有一可流出杂交洗涤废液的出口(310)，且上下密封盖(100，300)可闭合在一起。
- 9.如权利要求 8 所述的装置，其特征在于，下密封盖(300)的出口(310)还可作



为流式细胞仪的上样缓冲液的入口。

10. 如权利要求 8 所述的装置，其特征在于，该多孔的微孔杂交板(200)有 25-3000 个杂交孔(210)。

一种检测细胞内核酸的方法和装置

- 5        本发明属于细胞生物学、分子生物学及生物信息学领域。更具体地，本发明涉及一种新的检测细胞内核酸(如 DNA、mRNA)的方法和装置。

10        流式细胞术(flow cytometry, 简称为“FCM”)是近年来国际上兴起和发展的一项对单个细胞或其它生物微粒(如细菌、真菌、染色体、有机体和细胞聚合体等)进行快速定量分析与分选的一门技术。流式细胞术综合了激光、流体力学、计算机及电子测量等技术,在细胞分析的质和量及统计学的精度等方面的优势是以往任何细胞学、病理学等常规技术难以比拟的,所以 FCM 技术在基础医学研究等领域备受重视。FCM 是继电子显微镜后细胞学研究手段的又一次革命。

15        FCM 在医学基础研究中迅速发展的同时,它在临床医学中的应用也不断深入到各学科领域。FCM 检查是临床病理检查、生化检查等的一个有力的辅助手段。它可更客观,更精确地用于疾病诊断,同时它可作为一个估计预后的客观指标。FCM 检查还可以为临床治疗方案提供客观标准。FCM 对有些指标的检查分析是具有独立意义的。可以预见,在今后数年中,FCM 将成为临床医学中不可缺少的一种检查技术,推动临床医学进一步发展。

20        1. 流式细胞术的原理

25        流式细胞术的具体工作原理如下: 首先将待测细胞标记荧光物质,然后将标记后的单细胞悬液用一定压力压入流动室,并使样品细胞在流动室中央流动。同时,不含细胞的磷酸缓冲液通过鞘液管也被压入流动室,鞘液管入口方向与待测样品流成一定角度,这样,高速流动的鞘液就能够包绕着样品流,鞘液和样品组成一个圆形的流束。这种同轴流动的设计,可使样品流呈中心轴流状态,并恒定处于流动室的中央,从而避免了细胞的聚集。此外,通过调节压力系统,可改变样品流的直径,使待测细胞呈单行排列,后依次通过检测区域,避免了多个细胞聚集在一起对测定的干扰。

30        流式细胞仪的激发光源通常采用激光,这是由于激光光源稳定性好,能量高。经过聚焦整形的光束,垂直照射包绕在鞘液中央依次单个流过检测区域的细胞,不仅产生散射光,而且发射荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和 90° 方向的光电倍增管接收。光散射信号在前向小角度(0.5-2.0°)进行检测,称为“近前向

小角光散射”，这种信号基本上反映了所测细胞体积的大小；荧光信号的接收方向与激光束垂直，这些荧光信号经过一系列半透半反镜片和带通滤光片的分离，形成多个不同波长的荧光信号。荧光信号的强度代表了所测细胞膜表面抗原的浓度或所测细胞内物质的浓度，它经光电倍增管接收后被转换为电信号，这些电信号再通过模/数转换器，转换为可被计算机识别的数字信号。计算机内应用软件可对采集到的信号进行各种处理，并将分析结果显示在计算机屏幕上，也可将其打印出来，还可将其以数据文件的形式存储在硬盘上以备日后查询或进一步分析。检测数据的显示依据测量参数的不同，有多种形式可供选择。单参数数据以直方图的形式表达，其 X 轴为测量荧光强度（可以是线性轴也可以是选择对数轴），Y 轴为细胞数量。一般来说，流式细胞仪坐标轴的分辨率有 512 或 1024 通道数，这视其模数转换器的分辨率而定。对于双参数或多参数数据，既可以单独显示每个参数的直方图，也可以选择二维的散点图、等高线图、灰度图或三维的立体视图。

细胞的分选是通过分离含有单细胞的液滴而实现的。分选前在显示屏上圈起要分选的两群细胞，这相当于建立两个标准信号区。在测量细胞时，若所测的信号落入这个“区”中，则驱动逻辑电路，经过一段延时去触发充电电路，给这一要分离的液滴充电，即在流动室的喷口上配有一个超高频的压电晶体，将其充电后，压电晶体以每秒 4 万次以上的频率振动，可将从流动室喷出的液流分离为均匀的液滴，并可将这些液滴充以正负不同的电荷，待测细胞就分散在这些液滴之中。当带电的液滴流经有数千伏的偏极板时，在高压电场的作用下，这些带电的液滴发生偏转分别落入各自的收集器中，不带电荷的液滴落入中间的废液容器，即实现了细胞的分选。在高档流式细胞计中，细胞样品可染上多种荧光而可分成多个亚群，用多参数分选就可以获得多个亚群的细胞。

流式细胞术分选获得的细胞纯度可以达到 99% 以上, 是目前细胞分离纯化纯度最高的。

## 2. 流式细胞术的应用现状

流式细胞术在一分钟内可以对  $10^4$  以上细胞进行检测，非常快速。

细胞样品在不标记荧光时，也可得到 FSC 及 SSC 两个细胞形态方面的参数信息。可用两种或两种以上染料显示细胞的不同成分，也可用一种染料显示细胞的两种不同成分。标记一种荧光的测量为单参数测量，标记两种和两种以上荧光染料的测量为多参数测量。现在开展最多的是细胞成分测量(例如 DNA, RNA, 蛋白, 胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  及 pH 值的测量)及免疫荧光测量。

细胞成分测量中开展最多的是核内 DNA 测量。细胞在增殖过程中分为四期 G1,



S, M 及 G<sub>2</sub> 期, 还有 G<sub>0</sub>期。在这个过程中细胞核内 DNA 是变化的。G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> 期细胞的 DNA 为 2C 个单位, G<sub>2</sub>+M 期为 4C 个单位, S 期细胞 DNA 含量介于 2C-4C 之间。通过荧光染料对一群细胞细胞核内全部 DNA 的着染, FCM 检测可以确定这群细胞中处于各期的细胞分别有多少。应用与 RNA 结合的荧光染料可以检测细胞内总 RNA 的含量。目前 FCM 对 DNA 及 RNA 的检测仅应用于对细胞内全部 DNA、RNA 的含量检测, 即利用某种荧光染料与 DNA 或 RNA 特异结合的能力, 根据 FCM 检测到的荧光染料的量, 推算细胞内总体 DNA 或 RNA 的含量。然而, 这些 FCM 都不能对某一特定基因 DNA 片段(例如细胞内感染的巨细胞病毒 DNA 的某一片断)或细胞表达的某一种 mRNA 的量(例如白血病介素-2 的 mRNA)进行检测。

在免疫荧光测量方面, 主要是用 FCM 研究免疫细胞表面一些特征分子(表型)的表达。荧光染料标记的不同单克隆抗体, 通过抗原抗体反应与免疫细胞表面的特定分子特异性结合, 应用 FCM 可以检测到这些表型。根据某些表型可以确定不同免疫细胞的亚群, 或者了解细胞某些功能分子的表达水平。例如已经发现 T 细胞表面表达有多种抗原, 根据不同抗体与这些抗原的结合特性, 可把 T 细胞分成许多亚群; 对 B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞等也可通过表面分子的鉴定对其进行亚群鉴定。体外培养的免疫细胞用 PHA、PMA、LPS 或细胞因子等刺激后, 应用 FCM 检测可以了解其细胞表型的变化。另外, 免疫细胞在分化成熟过程中, 表面分子(表型)表达也不断发生改变, 应用 FCM 检测可以确定免疫细胞分化的阶段。此外, 在对内皮细胞、造血前体细胞、肿瘤细胞的鉴定, 对白血病细胞分型等方面, 流式细胞仪也能提供许多有价值的诊断和治疗信息。

已经发现 T 细胞表面在分化过程中表达有一百多种抗原和受体, 因此就可能结合多种荧光染料。将经过标记的细胞样品上机测试, 便可在显示屏上观察到不同的亚群。目前世界上已开展了在 T 细胞上染 4-5 种荧光染料的技术, 这对更精细地研究细胞亚群、T 细胞的增殖分化、功能很有意义。

应用流式细胞计的分选技术, 可以将某一所需的细胞亚群分离出来。目前分选主要用在免疫学方面, 如分选出多重标记的免疫细胞亚群, 加以进一步培养, 以供体外研究免疫细胞的成熟、分化、增殖等。

另一方面, 在 DNA、mRNA 的检测领域方面也取得了许多进展。随着人类基因组计划的顺利实施及分子生物学相关学科的迅猛发展, 越来越多的动植物、微生物基因组序列得到测定, 基因序列数据库正在以前所未有的速度迅速增长。怎样去研究如此众多的基因的生物信息及其在生命过程中所担负的功能, 成为全世界生命





科学工作者共同的课题，这就为大量 DNA、RNA 的序列鉴定及分析提出了更高的要求。

目前在分子生物学研究中检测、分析细胞内目标 DNA 的方法主要有 PCR、Southern 印迹法和原位杂交等；常用的 mRNA 检测方法有：RT-PCR、Northern 印迹法、核糖核酸酶保护测试(ribonuclease protection assay, RPA)和原位杂交等。此外还有近年发展起来的基因芯片技术。下面将分别阐述其检测机理及优缺点。

### (1)Southern 印迹法, Northern 印迹法

提取细胞或组织 DNA 或 RNA，经凝胶电泳分离后转移至硝酸纤维素膜上，以放射性物质标记的特异性探针与膜上核酸杂交，洗脱非结合的探针，结合的探针可以在底片上曝光，形成条带，从而确定靶 DNA 是否存在及其片段大小。此方法灵敏度高，特异性强。Northern 印迹法直接检测 mRNA 转录，可获得定量数据，但缺点是：操作量大，需毫克级的总 RNA 量；操作过程复杂，要求高，时间长，效率低，也不能确定混合细胞群或组织中哪些亚群的细胞表达，并有放射性同位素的接触。可以提供样本与其它样本间基因表达量的差异，但不能对某一给定样本中的 mRNA 进行绝对定量。

### (2)原位杂交

应用合成的特异性探针，在一定的生物结构基础上进行核酸杂交，这种生物结构基础可以是一条染色体、一个细菌、细胞或组织。步骤是将组织、细胞等粘附于玻片上，化学固定，消化，预杂交，其后加入特异性探针杂交及洗脱放大，其后进行显色反应(酶化学底物标记探针)或荧光镜检(荧光素标记探针)。原位杂交的优点是可以反映杂交发生的准确部位，即可以对特定基因准确定位；也可以结合细胞亚型荧光抗体的双标，明确在何种类型细胞中表达及百分率。但缺点是：难以对检测到的核酸定量，目测计数效率低，误差亦较大；另外，操作过程在暴露环境下进行，易污染 RNA 酶而使 mRNA 降解，从而导致失败；细胞，组织在检测过程中脱落亦是一个问题；操作过程中玻片干燥等一些意外情况也常导致检测失败。

### (3)PCR 和 RT-PCR

提取细胞或组织 DNA，对已知序列的基因片段，利用人工合成的引物进行 PCR 扩增；mRNA 经反转录成 cDNA 后再以特定引物进行 PCR 扩增。扩增产物经电泳分离后，可以检测到是否有目的基因的存在。此方法简便快捷，缺点是假阳性、假阴性情况时有发生。此外，由于从所有细胞、组织中提取 DNA、RNA，故也不能确定混合细胞群或组织中哪些亚群的细胞表达。



可对 mRNA 水平进行半定量测定。cDNA 与加入的外源性的已知分子量的竞争物同时被扩增，得到的序列产物与竞争物通过限制性酶结合位点、大小或杂交等方法得到区分，通过扫描或割下后液闪计数，可测定产物量。若在某一样本中竞争 PCR 产物量与靶 PCR 产物量相等则表明靶模板 DNA 量与竞争模板量相等，必需的条件是靶序列与竞争序列的扩增百分率相等。其优点是可定量检测 mRNA，敏感性高。但获得定量是较困难的，因为 RT-PCR 并非直接检测样本中 mRNA 的水平，而是检测由样品 mRNA 反转录生成的 cDNA 分子，因此，RT-PCR 的精确度就依赖于反转录步骤的保真度及指数级扩增过程的连贯性。另外，基因组 DNA 或先前检测扩增样本引起的污染也会引起假阳性。其他缺点包括：(1)难于在多个样本间比较；(2)RNA 提取效率及 cDNA 合成效率缺乏对照，并只能检测一个靶 mRNA。

#### (4)核糖核酸酶保护测试(ribonuclease protection assay, RPA)

RPA 的原理是将 cDNA 克隆入质粒，其后用作模板，利用 DNA 依赖的 RNA 聚合酶合成同位素标记的反义 RNA 探针，多种反义 RNA 探针同时与细胞或组织提取的总 RNA 样本液杂交，再以 RNases 消化去除未结合的核酸，结合的 mRNA/反义 RNA 探针复合物经电泳后，经放射自显影测定出各 mRNA 的水平。其优点是敏感性高，直接检测 mRNA 转录，可获得定量数据，可同时测定十数种 mRNA 的水平进行平行比较。缺点是操作量大，需毫克级的总 RNA 量，并且需凝胶电泳，操作过程繁杂，操作要求高，时间长，效率低，并有同位素的接触。此外，影响 RPA 测试结果的因素较多，并且也不能确定混合细胞群或组织中哪些亚群的细胞表达，即不能对单个细胞的 mRNA 水平进行测定。

#### (5)Northern ELISA

Northern ELISA 的原理是首先从细胞或组织中提取 poly(A)+RNA 样本，用化学方法标记生物素。同时，制备地高辛(DIG)标记的 DNA 探针。样本与探针进行杂交，杂交产物被 ELISA 板上预包被的链亲和素捕获，加入 HRP 标记的抗 DIG 抗体，以 TMB 显色，在酶标仪上读数，即可精确定量，该方法的敏感性较高。不足之处是需提取 poly(A)+RNA，并进行生物素标记，因而整个过程中操作繁杂，要求高，干扰因素较多。此外，对不同批次的重复性不佳，从而降低了其真正的精确性；对单细胞亦不能定量，只反映总体水平。

#### (6) PCR ELISA

PCR 扩增过程中在产物中标记上地高辛，PCR 产物变性后与生物素化特异性捕捉探针杂交，其杂交产物被链亲和素包被的微孔板结合，冲洗去除未杂交片段及非特异扩增产物，其后应用酶显色反应体系显色，在酶标仪上读数。通过设置内参照



或外参照，对产物实现半定量或定量。其优点是敏感性高，特异性高，缺点是需同时合成引物及特异性探针，并进行标记，加上 PCR 扩增过程，故准确度降低。

将竞争性 RT-PCR 与 PCR-ELISA 结合(即 RT-PCR-ELISA 方法)，可对 mRNA 实现半定量或定量。其优缺点同上。

#### 5 (7)X-Plore 检测

该方法的技术路线是针对待测 mRNA 基因设计两条探针，一为“侵袭(invader)”探针，另一为信号探针。二探针与待测样本杂交后形成部分重叠，应用 cleavase VII 酶识别二探针杂交后形成的重叠部分并切割信号探针，使之脱落成为信号探针片段；不断杂交-清除产生的信号探针片段被微孔板上固化的捕捉片段所固定，经 DNA 聚合酶补加 FITC-dUTP，其后将荧光信号级联放大并检测，获得标准曲线，即可定量得到检测样品的 mRNA 量。优点是快速，敏感，需要的总 RNA 量仅 0.5ug，不需凝胶电泳，可在 96 孔板中进行，以荧光体系检测，直接检测 mRNA 转录，可获得定量数据；缺点是操作过程繁杂，要求高，影响因素较多，并也不能确定混合细胞群或组织中哪些亚群的细胞表达。

#### 15 (8)基因芯片

基因芯片(gene chip)是指将大量探针分子固定于支持物上，然后与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号的强弱进而判断样品中靶分子的数量。该技术可以将及其大量的探针同时固定在支持物上，所以一次可以对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析。突出特点是高度的并行性，多样性，微型化及自动化，从而解决了传统核酸印迹杂交的技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少、效率低等不足。基因芯片可用于基因表达测定，突变检测及多态性分析、杂交测序、新基因分析等。目前基因芯片得到迅速发展，但由于技术尚未充分成熟，制作设备价格昂贵，工艺复杂等诸多因素，其完全推广实用尚有不少难度。

因此，本领域迫切需要一种快速、操作简便、并且结合细胞类型来检测细胞内核酸的方法。此外，本领域还迫切需要能够检测细胞中特定的核酸分子，并且能够定量或半定量地检测核酸的方法。

本发明人经过多年研究，成功地将流式细胞仪检测技术在细胞分析的质和量及统计学的精度等方面的无可比拟的优势应用于 DNA 和/或 mRNA 的检测分析，从而建立一种新的检测细胞内核酸的方法。该方法快速、操作简便、并且可结合细胞类型来检测细胞内核酸的方法。此外，方法还能检测细胞中特定的核酸分子，并且能够定量或半定量地检测核酸。



在本发明的第一方面，提供了一种检测细胞内核酸的方法，它包括步骤：

- (a)提供带有标记的特异性核酸探针；
- (b)固定待检测的细胞，并使待检测细胞内的核酸暴露；
- (c)将特异性的核酸探针与经固定的悬浮细胞的核酸杂交；
- 5 (d)洗涤掉未结合的核酸探针；
- (e)对与细胞内核酸杂交结合的核酸探针所携带的标记进行荧光级联放大；
- (f)用流式细胞仪对荧光进行检测，获得测量结果。

较佳地，核酸探针所带的标记选自下组：地高辛、生物素、荧光素、辣根过氧化物酶。

- 10 在另一实例中，该方法还包括步骤：用带荧光素标记的抗细胞表面分子或细胞内分子的单克隆抗体，对细胞进行标记，以区分不同类型的细胞。

在另一实例中，该方法还包括步骤：将步骤(f)中测量结果与参照物的测量结果进行比较，或者与标准曲线进行比较，从而得出定量结果。

- 15 在另一实例中，该方法还包括：在步骤(c)之前，进行预杂交以减少非特异结合背景。

在另一实例中，该方法还包括步骤(g)：对步骤(f)检测后的细胞进行流式细胞仪分选。这样，在流式细胞仪检测时呈阳性或阴性的细胞样本群，可以通过流式细胞仪的分选而获得高度纯化的样本，以便用于进一步的研究

- 20 在本发明的另一方面，提供了一种用于本发明方法的杂交洗涤装置，它包括：一多孔的微孔杂交板 200，在板上有多数(4-10000 个或更多)杂交孔 210，在微孔板底部上覆有玻璃纤维滤纸 202(可阻止细胞、细菌、染色体及其它检测样品的通过，但可允许液体及核酸探针等通过)；

一上密封盖 100，上密封盖 100 有一可引入杂交洗涤液的开口 110；

- 25 一输液针板 101，它具有多个位置与微孔杂交板上杂交孔 210 相对应的输液针 102，输液针的下部具有密封垫圈 103；

一下密封盖 300，下密封盖 300 有一可流出杂交洗涤废液的出口 310，且上下密封盖(100, 300)可闭合在一起。

在附图中，

- 30 图 1 显示了一种用于本发明方法的杂交洗涤装置。图 1A 显示了上密封盖 100 的结构；图 1B 显示了微孔杂交板 200 的结构；图 1C 显示了下密封盖 300 的结构；图 1D 是图 1B 中微孔 210 的局部放大示意图。



图 2 显示了一种用于本发明的自动化检测装置。

图 3 显示了用本发明方法对小鼠 T 细胞 IL-4 mRNA 表达水平的检测结果。图 3A-3F 分别是 PHA 刺激 0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时、10 小时后的检测结果。图中，实心区为阴性对照，空心区为探针检测样本，横坐标是荧光结合量。

5 图 3G 是对参照基因-管家基因 GAPDH 的检测结果。

图 4 显示了用本发明方法对细胞中感染的巨细胞病毒 (CMV) 核酸的检测结果。其中图 4A 为显示细胞形态的 FSC/SSC 窗口，其中根据细胞形态将外周血单个核细胞分为 (A) 粒细胞、(B) 单核细胞、(C) 淋巴细胞 (含 T 细胞和 B 细胞) 三群；图 4B、4C 和 4D 分别是粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的直方图；图 4E 是淋巴细胞散  
10 点图，图中，D 为 T 细胞群，E 为 B 细胞群。

简言之，本发明方法是将待测的单细胞悬液固定并以蛋白酶消化后，加入标记的特异性核酸探针在细胞悬液中与细胞内核酸杂交，再以荧光级联放大体系放大，最后用流式细胞仪检测荧光信号。此外，本发明方法也可同时与细胞表型鉴定  
15 等相结合，进行多参数分析。实现单细胞水平上对 DNA、mRNA 的简便、敏感、准确、高通量、多参数检测分析。本发明方法为基因表达测定、新基因分析等提供新的途径，可应用于细胞分化发育研究、基因多态性研究、免疫学机制研究、肿瘤生物学研究、新药筛选、EST 筛选及分析等多个领域。

20 本发明方法的技术特征在于，应用特异性核酸探针与经固定 (如化学固定) 的悬浮细胞内核酸杂交，然后经荧光级联体系放大，再以流式细胞仪检测细胞的荧光结合量，从而可以获知一系列生物信息。

本发明方法通常包括以下步骤：

#### 1. 特异性探针的制备与标记

25 如本文所用，“特异性探针”指探针的核苷酸序列与待检测的核酸分子的核苷酸序列是完全或几乎完全相同或互补的，从而能够特异性与待检测的核酸分子杂交。

根据条件及实验需要，可以制备 cDNA、RNA、寡聚核苷酸探针或多相寡聚核苷酸探针等多种形式的特异性核酸探针进行研究。选用适当方法将核酸标记上地高辛  
30 (也可以用生物素、FITC 等多种物质标记)。探针的合成和标记方法是可选用本领域中所熟知的各种常规方法。适用于本发明的标记物没有特别的限制或要求，可以选用本领域常用的各种非放射性标记物，例如地高辛、生物素、荧光素、辣根过氧



化物酶等。

带有标记的特异性探针，除了根据要求进行自行制备之外，也可以通过委托有关公司合成和购买得到。

在标记过程中，还可以用 96 孔培养板或更大量的微孔板进行，从而满足对大量样本检测的需要；杂交过程也可以设计为自动化操作，步骤规范化，从而对不同批次的样本保持条件的一致；由于离心操作次数较多，繁琐且易丢失样本，因而可以采用底部有孔的微孔板，孔上覆以玻璃纤维滤纸，连接负压吸引器(见附图 1)，这样标记和洗涤均在微孔中进行，简单快速，微量操作，且不丢失样本，可实现大量样本的同批操作。杂交完成后可转入试管检测，或者应用与此微孔板相适应的上样设备进行自动化流式细胞仪检测(见附图 2)。

## 2. 细胞收集，固定或贮存：

对于待检测的细胞，可用常规方法分离获得细胞样品，然后加以固定。分离细胞和固定细胞的方法可选用细胞学领域，尤其是流式细胞术检测领域中各种常用方法。

可用本发明方法检测核酸的细胞包括动物细胞、人细胞、植物细胞、细菌、真菌、酵母，也包括细胞核、线粒体、染色体、含核酸分子的人工合成物等。

例如，一种固定方法是可以从人或动物上获取细胞，或通过体外培养而获取人类或动物细胞，离心收集后，加入多聚甲醛(或其它固定剂)固定。

如需贮存，可进一步以 70%冰冻酒精固定，于-20℃可保存数月；或应用商品化的含有抑制 RNA 酶的试剂保存样品。

## 3. 暴露核酸分子

暴露核酸分子的步骤通常是通过破细胞膜而实现的，同时保持细胞的原有结构。本领域常用的各种破细胞膜的方法都适用于本发明方法。一种较佳的方法是用化学方法破细胞膜，从而使核酸分子暴露出来。例如，将待检测样本以约 0.1%的皂素破膜，蛋白酶 K 消化 2-15 分钟，使部分胞浆内蛋白质及与核酸结合的蛋白质被消化，从而暴露出 DNA, mRNA 核酸片段。

其他适用于使核酸分子暴露的条件有：(1)1% Triton 100 处理 5-15 分钟，然后用蛋白酶 K 消化 2-15 分钟；(2)70%乙醇 -20℃ 过夜(或 24 小时)，然后用蛋白酶 K 消化 2-15 分钟。

## 4. 特异性探针与待测核酸的杂交：

将带有合适标记的特异性探针与待检测核酸进行杂交，是本发明的重要步骤。杂交宜在高度或中度严格条件下进行，从而使得探针和待测核酸只能形成特异



性杂交，而不能形成非特异性的杂交。本领域的熟练技术人员，能够根据待检测核酸不同、以及探针的不同，而选择合适的杂交条件。此外，在杂交中还可设置阳性和/或阴性对照。

一种具体的杂交方法是将样本平均分入各杂交管中；阳性对照管中加入例如  
5 含识别管家基因探针的原位杂交液，阴性对照管加入不含标记探针的原位杂交液，待测样本管分别加入含各标记探针的原位杂交液(一管中可加入一种探针，或加入不同物质标记的识别不同靶分子的数种探针)放入 95℃水浴中 5-10 分钟，取出后迅速插入碎冰中，保持 3 分钟。其后置 37℃，根据探针的性质杂交 2-24 小时(应用商品化的杂交促进液可使 DNA 探针与靶 DNA 分子的杂交结合时间缩短为 2 小  
10 时)。在杂交后，带标记的特异性探针就与待测的核酸分子形成了“标记物-探针-待测核酸”的复合物。

此外，在杂交之前，还可任选地增加预杂交步骤，例如加入预杂交液预杂交 30 分钟，以减少非特异结合降低背景。

#### 5. 杂交后洗涤：

15 在杂交后，通过洗涤将未杂交的探针除去。适用于本发明方法的洗涤方法可以是本领域中常规的各种洗涤方法。一种具体的洗涤方法是用 2×SSC 洗涤细胞 2 次，0.1×SSC 洗涤 1 次。

#### 6. 荧光级联放大：

在洗涤除去未结合的特异性探针之后，可根据具体情况选择多种荧光级联放大  
20 大体系(如加入生物素标记的小鼠抗地高辛抗体孵育，其后加入抗生物素-FITC 或链亲合素-FITC 孵育)，从而产生可供检测荧光信号。本领域中的各种荧光级联放大体系都可用于本发明方法，代表性的荧光级联放大体系包括(但并不限于)：地高辛-生物素标记的小鼠抗地高辛单抗-FITC 标记的亲合素。

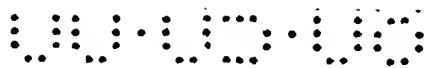
在有些情况下，例如检测细胞中含量丰富的某些 DNA 分子，也可直接应用荧光  
25 素标记探针杂交，此时就不需进一步放大。当然，对于在细胞中丰度中等或较低的核酸分子，宜采用荧光级联放大体系来放大信号。

此外，当使用带不同标记物并识别不同靶分子的数种探针时，则应用结合不同荧光素的放大体系进行放大，以便能够同时检测数种待测核酸分子。

如果需要，例如需要结合细胞类型来检测细胞内核酸时，可进一步加入一种  
30 或数种带其它荧光素(如 PE, APC)标记的、抗细胞表面分子或细胞内分子的单克隆抗体，对细胞进行标记。以便区分不同的细胞类型。

#### 8. 流式细胞仪检测分析或分选：





最后，用流式细胞仪检测荧光信号，获得测量结果。对于荧光信号，可用细胞分析软件分析处理，获取数据，分析细胞阳性率、核酸表达水平等。此外，可将测量结果与参照物的测量结果进行比较，或者与标准曲线进行比较，从而得出定量结果。

5 如果需要，对感兴趣的细胞可以经流式细胞仪可进行进一步分选，用于下一步实验。应用流式细胞仪的分选功能，可以实现对特定细胞的高纯度分选，从而对其做进一步的分析，包括提取核酸以进一步分析，或者做进一步的蛋白分子分析。这对于一些仅知道部分基因序列暂不知道氨基酸序列的分子有特别的意义，因为通过分选获得表达此类基因的细胞，进一步对此类细胞分析后可以知道此类基因表达的细胞类型及其表达的调控因素，即在未知蛋白质的情况下获知其生物学信息，且信息量极大。

上述为代表性的过程。在具体应用中，根据实验样本的特性、实验条件等因素，可以选择不同的探针及荧光标记体系，需保证的是杂交的特异性与敏感性。合适的探针和荧光标记体系的选择，对于阅读了本发明的本领域技术人员而言，是在其技能范围之内的。例如，本领域技术人员都知晓，对 mRNA 的检测，所有溶液应以 DEPC 或类似的试剂处理，以抑制内源性 RNA 酶。

此外，在本发明方法中可以用一种或数种探针，对不同处理方式和/或不同处理时程的同一种细胞，以及对不同类型和/或不同发育阶段的细胞进行检测。这种细胞或其他类型的样本可以由各实验室根据其实验方案制备，也可以由某些部门提供标准化的供应，提供某些样本或已预制的放有各类不同或相同确定样本的微孔（数百至数千孔）杂交板。

本发明方法尤其适用于多探针及多通道分析。在本发明方法中，应用两种或两种以上的针对不同核酸分子、并经不同标记的核酸探针，对同一样本进行杂交，再经不同的荧光级联体系标记放大，应用流式细胞仪进行多道荧光的检测，可同时检测到同一样本的多个核酸分子表达情况。对同一样本，核酸探针对核酸的杂交标记与单抗对蛋白质分子的标记相结合运用，或与细胞形态分析相结合，经流式细胞仪检测可获得多参数分析。

本发明方法与常规流式细胞术的区别在于：本发明用特异性的核酸探针与待检测细胞的核酸进行杂交，而不是用抗细胞表面分子或细胞内分子的单克隆抗体对细胞进行标记，也不是用非特异性的核酸探针进行杂交。

本发明方法与常规原位杂交的区别在于：本发明中所用的细胞样本为悬浮细胞，而且在杂交和信号放大后采用流式细胞仪进行检测，从而可以大规模地检测并





可对细胞进行有效的分选；而原位杂交采用的细胞样本是非悬浮细胞(如细胞块)，而且在核酸杂交后往往采用放射性自显影等方式进行检测，而且不能对细胞进行有效的分选。

本发明也提供了一种用于本发明方法的杂交洗涤装置。参见图 1，该装置包括：(A)一多孔的微孔杂交板 200，在板上有多数(4-10000 个或更多，通常为 10-5000 个，较佳地 25-3000 个，更佳地为 100-2000 个)杂交孔 210(或称为微孔 210)，在微孔板底部上覆有玻璃纤维滤纸 202。玻璃纤维滤纸 202 可阻止细胞、细菌、染色体及其它检测样品的通过，但可允许液体及核酸探针等通过。微孔板可有不同  
10 的型号，如 10×10，20×20，40×40，40×60，80×80 等。孔的深度通常为 0.25-2 厘米，较佳地 0.5-1 厘米，直径一般为 0.1-2 毫米，较佳地为 0.5-1 毫米，以保证有足够的空间放置细胞或其他样本。此外，也可设计固定阵列的微孔板(如 120×100 孔)，根据所需选用其中部分孔。根据同样品的体积不同，可设计不同孔径的微孔板。例如对于检测细菌样本是可设计小孔径的微孔板。此外，同一微孔板上各杂交孔的直径可相同或不同。在微孔板的底部有多个小孔，上面覆盖  
15 着玻璃纤维纸，该玻璃纸被压制/粘贴于底壁上，从而在洗涤过程中允许液体流过而不会让样本流失。

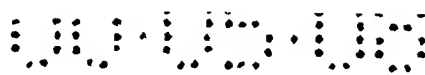
(B)一上密封盖 100，上密封盖有一可引入杂交洗涤液的开口 110。该开口 110 可与连接各种杂交洗涤液 10(10A、10B、10C)的输液管 20 相连，以引入杂交洗涤液。

20 (C)一输液针板 101，它具有多个位置与微孔杂交板 200 上杂交孔 210 相对应的输液针 102，输液针 102 的下部具有密封垫圈 103。该输液针板 101 用于引入的杂交洗涤液再分别导入微孔杂交板的各杂交孔中。

(D)一下密封盖 300，下密封盖 300 有一可流出杂交洗涤废液的出口 310，且上下密封盖可闭合在一起。下密封盖的出口 310 与废液导管 60 相连，用于排出  
25 杂交废液。杂交废液可通过一负压泵 50 而收集在废液收集瓶 40 中。

此外，下密封盖(300)的出口(310)还可作为流式细胞仪的上样缓冲液的入口。换言之，该出口 310 也可与流式细胞仪的上样缓冲液管 70 相连，以便在杂交及荧光标记完成后用此上样缓冲液 30 将样本悬浮并吸入流式细胞仪的检测管道，进行检测。

30 在使用时，将带输液针板的上密封盖与微孔杂交板相匹配地对准装配好，然后与下密封盖闭合在一起。这样，各输液针就对应于各杂交孔，并且密封垫圈密封了两者之间的间隙。当负压泵吸引后，杂交洗涤液就可经各微孔后收集于废液



瓶中。根据杂交/标记步骤，不同的杂交洗涤液可根据需要定时自动转换。

另一种方式是提供大量(数百种至数千种,或更多种)不同的预制的探针,含这些探针的杂交液被分别放置在与微孔板相应的阵列排列的小管中,有确定的位置,当待检样本经蛋白酶消化后加入杂交管或孔中预杂交后,同时加注预制的探针进行杂交,从而实现高通量的检测和筛选。从广义上说,这是另一种类型的基因芯片。

在本发明方法中,设置阳性对照和/或阳性对照是优选的。阴性对照的设置,除了不含探针外,其余过程均与样本一样,从而可排除荧光物质的非特异性结合,排除假阳性。对于阳性对照,可设置针对例如数种管家基因(或其他在待检测细胞中普遍存在的基因)的探针,以排除假阴性。

在本发明的另一优选例中,本发明方法可提供核酸含量的定量数据(相对含量或绝对含量)。例如,可设置针对一些表达量恒定的 mRNA (例如  $\beta$ -肌动蛋白) 的探针杂交的阳性参照,提供表达量的参照。通过与参照的比较,得出待检测核酸的相对数量。

此外,还可先制备或提供数量已知的某一基因的多个阳性样本(标准参照物),以及已含所述基因的阴性样本的对照,然后用相同方法测得荧光强度值,从而绘制出标准曲线。对于待检测样品,在测得了荧光强度值后,便可利用该标准曲线得出待检测核酸的绝对数量(例如在每个待测细胞中该核酸的拷贝数),从而对各检测样本此基因的表达水平做出定量。

对于细胞或其他类型样本的数量,并没有特别的限制,可根据具体情况变动。例如,对一种 T 细胞系不同刺激条件诱导 IL-2 mRNA 表达水平的检测,在流式细胞仪检测中收集  $10^3$ - $10^4$  细胞,即可获得代表性的数据。对于占样本中较低比例细胞的检测,可以收集  $10^5$  甚至更多的细胞进行检测,从而获得代表性数据,如对骨髓细胞中 CD34<sup>+</sup>细胞(约占骨髓细胞的 1%) IL-3 受体 mRNA 表达水平的检测,收集  $10^5$  骨髓细胞,即可对  $10^3$  的 CD34<sup>+</sup>细胞检测,从而获得代表性的数据。再如对感染 HBV 病毒的外周血 T 细胞的检测,可以获知感染细胞的百分率及细胞中病毒的拷贝数,在病毒感染的初期,可以通过收集  $10^5$  甚至更多的细胞进行检测,从而发现其中极少量的病毒感染细胞。

图 2 显示了一种用于本发明的自动化检测装置。它包括流式细胞仪 401、进样管 402、自动移位器 404、机械臂 403 和样本收集头 405。在运作时,自动移位器 404 控制机械臂 403,将样本收集头 405 按固定的时间间隔按序接到输液针头的上口,密封后吸出孔中的细胞,流入流式细胞仪 401 进行检测。此时,下密封盖换接上流式细胞仪上样缓冲液,从而实现自动操作。流式细胞仪的进样方式通



常为正压式，也可采用负压式。

现有的各种型号的流式细胞仪工作原理基本相同，均可以用于本发明方法，实现上述检测的步骤。对于大量样本的检测，可以应用自动上样装置，自动完成大量样本的收集、检测。目前流式细胞仪最多可识别 7 种不同的荧光，因而对一个标  
5 本可以同时标记数种荧光，在流式细胞仪上进行多参数分析，结合相应的各类数据分析处理软件，可以自动输出分析结果。

由于细胞表达的蛋白质分子的数量变化通常是以指数级增减的，因而目前流式细胞仪数据采集、分析图中的代表荧光强度的数轴大多也是以指数递增的。在本发明的应用中，对于表达数量以指数级差异变化的基因，可以应用类似的软件收  
10 集、分析样本；对于表达数量非指数级差异变化的基因，可以应用新的以线性数轴代表荧光强度的软件收集、分析样本。

另外在杂交完成后，也可应用类似于酶联检测仪的荧光读数仪检测微孔杂交板中各孔的荧光强度，单参数检测核酸表达水平。由于是  $10^3$ - $10^4$  细胞的累积荧光强度，因而信号较强。

15

可用本发明方法检测的核酸包括：DNA、RNA 和 EST(已表达序列标志，expressed sequence tag)。本发明尤其适用于检测 mRNA 和 EST。

本发明方法对 DNA 的检测，包括对靶 DNA 的表达谱和表达水平，例如病毒 DNA 感染细胞类型的确定及病毒拷贝数，人工转染 DNA 的检测，重复序列基因多态性的  
20 检测等。对 mRNA 的检测，可以测知靶 mRNA 的表达谱和表达水平。结合多个荧光标记单抗及荧光标记核酸探针的多参数分析，可以获得大量的生物学信息。

具体而言，本发明应用范围主要包括以下几个方面：

#### 1. 功能基因组研究：

各类细胞样本以不同的生物活性因子(如各类蛋白质、脂多糖、凝集素、细胞  
25 因子、神经肽、核酸分子、脂类、多糖及其他生物活性物质等)作用不同时间，然后收集样本检测其中一系列特定 mRNA 分子的表达水平，包括各种已知全长基因序列的 mRNA(包括已知全长基因序列但目前尚不能人工表达相应蛋白质分子及/或尚没有获得抗体的分子)及仅知部分基因序列的 mRNA(表达序列标签，EST)，从而获知这一系列基因表达的调控因素，或者某种生物活性物质对这一系列基因表达的  
30 调控能力。结合单抗对细胞亚型分析、发育阶段分析、蛋白质表达分析等一系列多参数检测分析，可以揭示大量基因的大量功能信息。对于细胞因子调控网络、癌变的影响因素及分子机理、分化发育调控因素等众多研究都可以提供丰富的生物学信



息。

## 2. EST 表达分析及筛选:

近年来全世界已获得了 150 万条以上的 EST, 由于无全长基因序列、无蛋白质分子及抗体, 目前只能根据其已知序列的核苷酸特征进行同源比较及功能预测, 因而目前只有极少部分的 EST 得到进一步深入研究。制备针对 EST 的特异性核酸探针, 应用流式细胞仪检测其在各类细胞中的表达谱及不同刺激因素、不同分化发育条件下的表达水平, 可获知 EST 的诸多生物学信息。由此也可以高通量筛选出值得目前进一步研究的对象及研究的大体取向。

## 3. 药物机理研究及筛选:

通过流式细胞仪高通量检测药物对细胞或其它样本一系列基因表达的影响, 可以分析其作用机理、应用剂量、作用时效等, 也可以发现其新的药理学功能。在新药筛选开发中也可发挥巨大作用。

## 4. 疾病诊断治疗:

通过对机体生理、病理状态下基因表达调控的大规模检测分析, 可以获得丰富的信息, 包括机体各类生理、病理状况的分子机制、基因表达特征等, 从而为疾病的诊断、治疗、预后等提供指导。

总之, 本发明可广泛应用于功能基因组研究、EST 表达分析及筛选、药物机理研究及筛选、疾病诊断治疗等多个领域。

## 发明效果

本发明应用流式细胞仪检测核酸杂交结果。发挥流式细胞仪检测快速、敏感、准确、分析样本数量大代表性高、多道荧光检测及计算机多参数分析处理数据、可以分选样本等多种优势。不需提取 DNA、RNA, 不需 PCR 扩增, 不需凝胶电泳, 在试管或多孔板中进行, 以荧光体系检测, 直接检测靶 DNA 序列或 mRNA 转录, 可获得半定量、定量数据。可以快速分析大量样本(每天可检测数千样本/每台流式细胞仪)。

与已有的基因芯片相比, 制备过程简单、成本低、时间短、选择应用探针自主性大, 获得部分信息后, 进一步深入研究灵活性大、速度快, 不必依赖芯片制造商而可以自主展开研究, 既可以高通量检测, 也可以少量样本检测, 避免了不必要的浪费。此外, 其对同一样本多参数检测分析是已有的基因芯片无法实现的。对一些微量细胞不需分离纯化、通过单抗识别即可在流式细胞仪上样过程中分群检测。对一些目前无法分离的细胞, 利用探针同时标记具有另一些已知特征性基因的细



胞，可以实现对靶基因表达谱的分析。这些都是已有的基因芯片无法实现而又对功能基因组学研究具有极大价值的方面。这些都是本发明独具的特色和优势，是目前其它方法无法替代的。

5 总之，本发明将细胞生物学与分子生物学有机结合，成为二者研究的结合点，从而能够提供大量的生物学消息。

具体而言，可以获得如下诸方面的信息及优势：

#### 1. 定性：

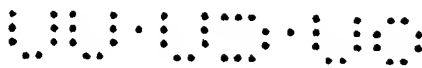
10 理论上结合 1000 个 FITC 荧光分子的微球即可在流式细胞仪上测出；通过级联放大体系，目前的原位杂交技术可以检测到单拷贝基因，故本发明中样本通过核酸探针特异杂交结合后，应用适当的级联放大体系，流式细胞仪检测可以实现对单拷贝基因在细胞中的存在、表达的鉴定。通过设置严格对照，可做到高灵敏度，高特异性。例如检测细胞是否感染某一病毒、细胞是否成功转染目的基因、多核苷酸位点基因多态性片断的存在、某一类细胞是否表达某些 mRNA 等。

#### 2. 定量：

15 通过设置已知的阳性参照，可根据每一检测样本的平均荧光强度，半定量或定量测出特定 mRNA 的表达量或 DNA 的数量。由于直接对细胞内的核酸进行杂交，不需经过核酸提取及 PCR 扩增，因而失真性小；又由于流式细胞仪可快速检测  $10^4$ 、 $10^5$  甚至更大量的细胞，故取其平均荧光强度可以更为精确地反映某一核酸在某一特定细胞群中的表达水平。而在原位杂交检测中，难以进行半定量、定量分析，并且镜下观察的细胞数量少，代表性不强。另外，通常在某一时间点上一群细胞中特定基因的表达在各细胞中的水平差异是较大的，提取核酸检测靶基因的方法，只能将所有样本的核酸混合后再检测，只能反映总的平均水平，而流式细胞仪检测的方法则可以实现对单细胞的分别检测，可以反映特定基因不同表达数量范围内的分布细胞的百分率，因而更为精确和细致。流式细胞仪对细胞的计数准确，对表达量均  
25 一的样本，可以计算出单个细胞的平均表达量。用其它方法是无法达到这种精度的。用本发明方法可以实现对细胞病毒感染拷贝数、人工转染基因拷贝数、重复序列基因多态性、mRNA 转录水平等的分析。

#### 3. 定时：

30 可在所需的各个不同时间点将样本收集、固定，准确地检测得知某一时间点的特定核酸的存在或表达水平；不同时间点收集的样本也可固定后贮存，全部收集完成后同批检测，可避免不同检测批次间的误差。而对细胞表达分子的蛋白质水平的检测，ELISA 只能测出某一时程的累积产量，而不能反映特定时间点的表达量，



流式细胞仪检测蛋白质分子的表达量也是累积量,而本发明则对基因转录水平进行检测,可以更直接、更灵敏地反映靶分子的变化情况。尤其对于分泌型的蛋白质分子表达调控的研究具有极大的优势。对细胞分化发育过程中各基因在不同时程开启与关闭的研究也有较大应用价值。

5           4. 定细胞的类型或分化发育阶段:

应用第一种核酸探针检测靶基因,同时通过应用第二种荧光标记的特异性单抗(如 CD3-PE、CD4-PE、CD8-PE、CD19-PE CD14-PE 等)染色,可测知特定核酸在何种细胞类型及亚群(T 细胞及其亚群、B 细胞、单核细胞等)中存在或表达及其数量。如果应用第二种荧光标记的识别分化抗原的抗体或核酸探针(应用第二种荧光级联放大体系),可测知特定核酸在何种分化发育阶段的细胞中表达。

10           由于对细胞亚群及分化发育阶段的精细确定一般需要有数种分子的鉴定,利用流式细胞仪对三色、四色甚至七色荧光的检测,可更精确地分析靶核酸分子在何亚群及何种分化发育阶段细胞中存在及数量。同时此种多参数的检测也可实现对微量细胞的分析,而不需要先对其分离纯化。这在其它的检测方法是无法实现的。考虑到某些微量细胞的分离纯化是极其复杂的且可能会影响细胞的生物学性状,而且某些细胞目前无法分离纯化,本发明则可以为这些目前无法或尚无有效方法分析研究其生物学功能的分子提供较好的研究途径。

          5. 在同一样本中数种 mRNA 表达水平同时检测:

20           可以通过双标记、三标记或更多标记的方法,测定在同一时间点采集的同一批样本中二种,三种,甚至更多种 mRNA 表达的水平,从而获知其相互的关联。通过不同时间点的比较,可得出各特定 mRNA 水平的增减情况,从而判断其相互作用及时程,这在信号转导分子的研究中及细胞因子相互作用的研究中尤为有用。

25           由于本发明具有如前所述的诸多优势和特色,因而可广泛应用于功能基因组研究、新药筛选开发、疾病诊断治疗等多个领域,并拥有一些其余现有方法无法取代的功能。

下面结合实施例进一步地描述本发明,这些实施例仅用于阐述本发明而不用以以任何方式限制本发明。

30           **实施例 1 小鼠 T 细胞 IL-4 mRNA 表达水平的检测:**

          1. 特异性探针的制备与标记:

          合 成 针 对 小 鼠 IL-4 mRNA 的 寡 聚 核 苷 酸 探 针 (5'-



TGCTCCAGTGTCTCTTCCCTGCGGTACGT-3')及针对管家基因 GADPH 的探针,用地高辛加以标记。

## 2. 细胞处理、收集、固定:

取指数生长期的小鼠 T 细胞系 EL4, 加入含 PHA(10ug/ml)的完全培养基, 悬浮为  $5 \times 10^5$  细胞/ml,  $37^\circ\text{C}$ , 5%二氧化碳孵箱培养, 于 0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时、10 小时分别收集  $2 \times 10^6$  细胞于各试管中, 400g 离心, 弃上清, 以 5ml PBS 悬浮, 加入 2%多聚甲醛(或其它固定剂) 5ml, 混匀后室温固定 15 分钟。

## 3. 暴露 mRNA 核酸片段:

用 0.5M TBS(PH7.2-7.6)洗细胞 1 次, 弃上清后加入 0.1%的皂素  $500 \mu\text{l}$ , 置室温 15 分钟破膜。用 0.5M TBS 洗细胞 1 次, 弃上清后加入  $1 \mu\text{g/ml}$  蛋白酶 K(于  $0.1\text{mol/L}$  Tris,  $50\text{mmol/L}$  EDTA, pH8.0 缓冲液中)  $500 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 消化 15 分钟。

## 4. 预杂交:

用 0.5M TBS 洗涤 3 次, 弃上清后加入预杂交液  $150 \mu\text{l}$ ,  $42^\circ\text{C}$  水浴 30 分钟。

## 5. 杂交:

各样本按  $50 \mu\text{l}$ /管将细胞平均分入 3 个试管中; 第一管(阳性对照)加入  $50 \mu\text{l}$  原位杂交液(含  $1.0 \mu\text{g/ml}$  的识别管家基因的标记探针), 第二管(阴性对照)加入  $50 \mu\text{l}$  原位杂交液(不含标记探针), 第三管加入  $50 \mu\text{l}$  原位杂交液(含  $1.0 \mu\text{g/ml}$  针对小鼠 IL-4 mRNA 的标记探针)。混匀后将杂交试管加盖拧紧, 放入  $95^\circ\text{C}$  水浴中 5-10 分钟, 取出后迅速插入碎冰中, 保持 3 分钟。其后置  $37^\circ\text{C}$ , 杂交 24 小时。

## 6. 杂交后洗涤:

加入  $25^\circ\text{C}$  的  $2 \times \text{SSC}$  1ml/管, 洗涤细胞 2 次, 加入  $37^\circ\text{C}$  的  $0.1 \times \text{SSC}$  1ml/管洗涤 1 次。弃上清。

## 7. 荧光级联放大标记:

加入  $5 \mu\text{g/ml}$  生物素标记的小鼠抗地高辛抗体  $100 \mu\text{l}$ /管, 在  $25^\circ\text{C}$  放置 20 分钟。用 0.5M TBS 洗 3 次。加入抗生物素-FITC 或链亲合素-FITC  $100 \mu\text{l}$ /管。避光和  $25^\circ\text{C}$  下放置 20 分钟, 随后用 0.5M TBS 洗 3 次。

## 8. 流式细胞仪检测分析:

各管加入 0.5M TBS 0.5ml, 震荡混匀细胞后, 以流式细胞仪(BD 公司, FACS-calibur)收集细胞, Cellquest 软件检测、分析。

结果显示, 小鼠 T 细胞系 EL4 有自发低水平的 IL-4 mRNA 表达, 以 PHA 刺激 2 小时表达显著增加, 6 小时达峰值, 其后下降(图 3A-3F)。GADPH 是作为核酸含量的参照物, 在各时间点的样本中 GADPH 的水平相近, 故测得各时间点的样本中 IL-4





mRNA 的水平是具有较好可比性的。

## 实施例 2 对细胞中感染的巨细胞病毒(CMV)核酸的检测:

### 1. 特异性探针的制备与标记:

5 合成特异性地针对人 CMV DNA 的寡聚核苷酸探针 (5'-GAGGCTATTGTAGCCTACACTTTGG-3') 及针对管家基因 GADPH 的探针,用地高辛加以标记。

### 2. 细胞处理、收集、固定:

10 从经 PCR 证实感染 CMV 的患者抽取外周血 2ml, 溶红细胞液处理溶除红细胞, 以 5ml PBS 悬浮, 加入 2%多聚甲醛(或其它固定剂) 5ml, 混匀后室温固定 15 分钟。

### 3. 暴露核酸片段:

用 0.5M TBS (PH7.2-7.6) 洗细胞 1 次, 弃上清后加入 0.1%的皂素 500  $\mu$ l, 置室温 15 分钟破膜。用 0.5M TBS 洗细胞 1 次, 弃上清后加入 1  $\mu$ g/ml 蛋白酶 K(于 0.1mol/L Tris, 50mmol/L EDTA, pH8.0 缓冲液中) 500  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C, 消化 15 分钟。

### 15 4. 预杂交:

用 0.5M TBS 洗 3 次, 弃上清后加入预杂交液 150  $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟。

### 5. 杂交:

20 各样本按 50  $\mu$ l/管将细胞平均分入 3 个试管中: 第一管(阳性对照)加入 50  $\mu$ l 原位杂交液(含 1.0  $\mu$ g/ml 的识别管家基因的标记探针), 第二管(阴性对照)加入 50  $\mu$ l 原位杂交液(不含标记探针), 第三管加入 50  $\mu$ l 原位杂交液(含 1.0  $\mu$ g/ml 针对人 CMV DNA 的标记探针)。混匀后将杂交试管加盖拧紧, 放入 95 $^{\circ}$ C 水浴中 5-10 分钟, 取出后迅速插入碎冰中, 保持 3 分钟。其后置 37 $^{\circ}$ C, 杂交 24 小时。

### 6. 杂交后洗涤:

25 加入 25 $^{\circ}$ C 的 2 $\times$ SSC 1ml/管, 洗涤细胞 2 次, 加入 37 $^{\circ}$ C 的 0.1 $\times$ SSC 1ml/管 洗涤 1 次。弃上清。

### 7. 荧光级联放大:

加入 5  $\mu$ g/ml 生物素标记的小鼠抗地高辛抗体 100  $\mu$ l/管。在 25 $^{\circ}$ C 放置 20 分钟。用 0.5M TBS 洗 3 次。加入抗生物素-FITC 或链亲合素-FITC 100  $\mu$ l/管, 在避光和 25 $^{\circ}$ C 下放置 20 分钟。用 0.5M TBS 洗 3 次。

### 30 8. 荧光抗体标记:

加入 5  $\mu$ g/ml 抗 CD3-PE 100  $\mu$ l/管, 在避光和 25 $^{\circ}$ C 下放置 20 分钟。用 0.5M TBS 洗 3 次。



## 9. 流式细胞仪检测分析:

各管加入 0.5M TBS 0.5ml, 震荡混匀细胞后, 以流式细胞仪(BD 公司, FACS-calibur)收集细胞, Cellquest 软件检测、分析。

结果显示, 在 FSC/SSC 窗口, 可以根据细胞形态将外周血单个核细胞分为(A) 粒细胞、(B)单核细胞、(C)淋巴细胞(含 T 细胞和 B 细胞)三群(图 4A)。在经 PCR 证实感染 CMV 病毒患者的三群细胞均有荧光结合, 其中以单核细胞的结合量最多(图 4B、4C 和 4D)。在用抗 CD3-PE 单抗标记拉出的 T 细胞群的荧光结合量低于 B 细胞群的结合量(见图 4E), 这表明结合识别细胞表型的单抗分析, 可以更精确地阐明病毒感染的特性。

10

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

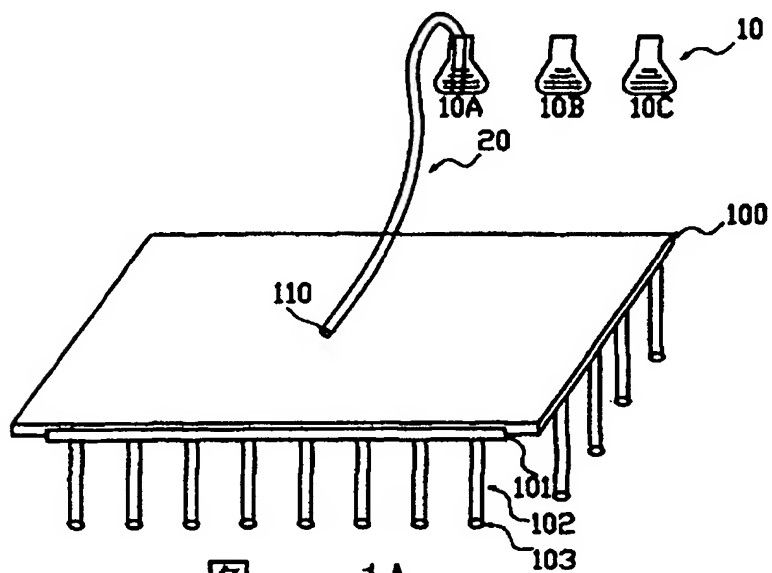


图 1A

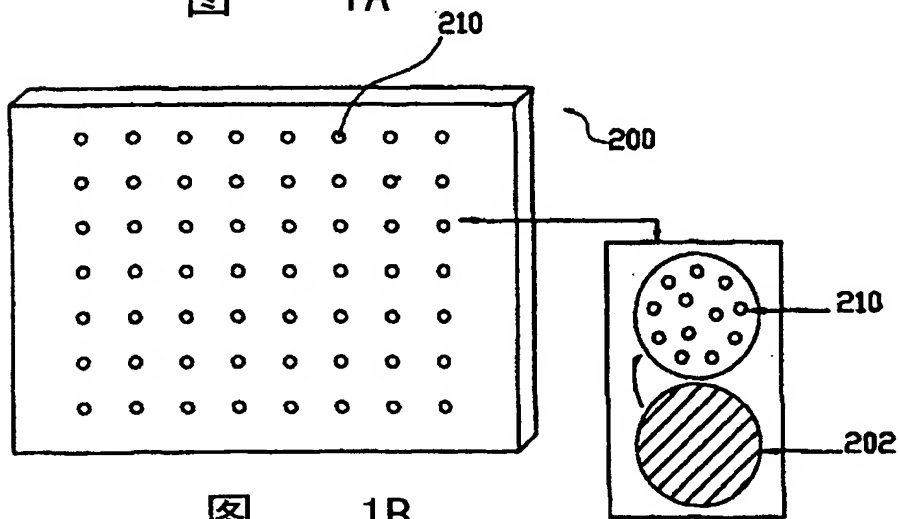


图 1B

图 1D

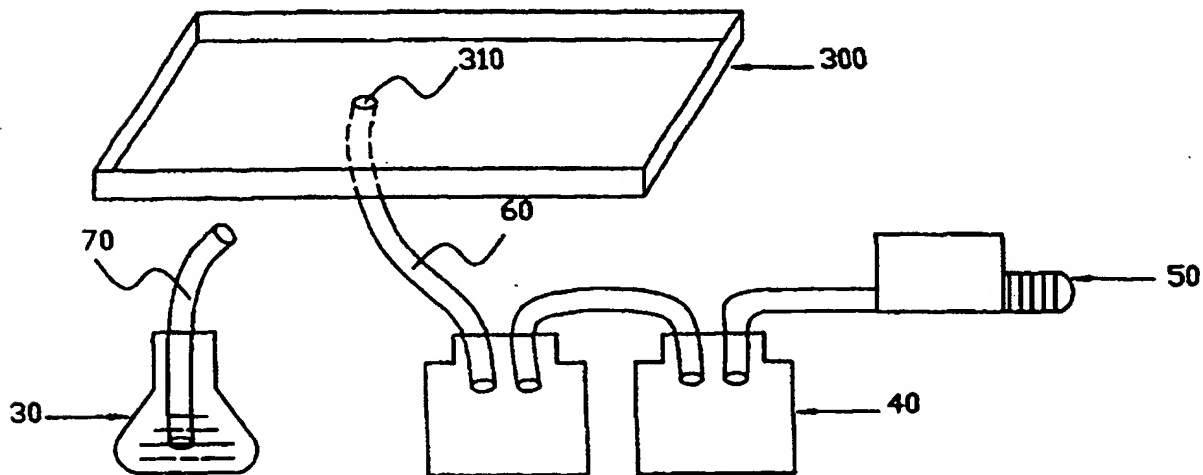


图 1C

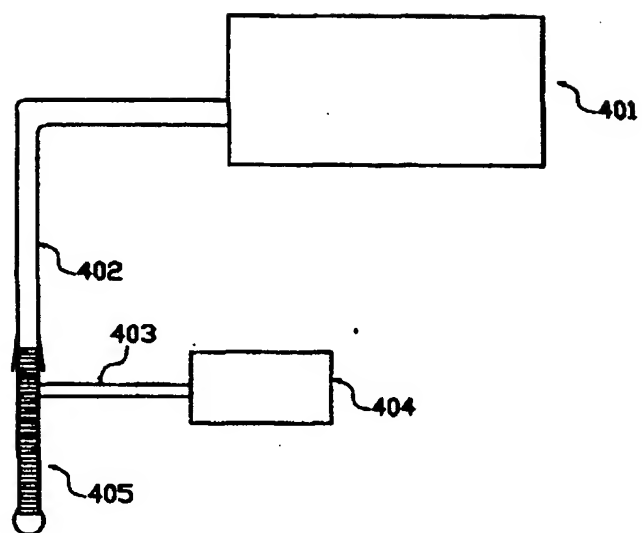
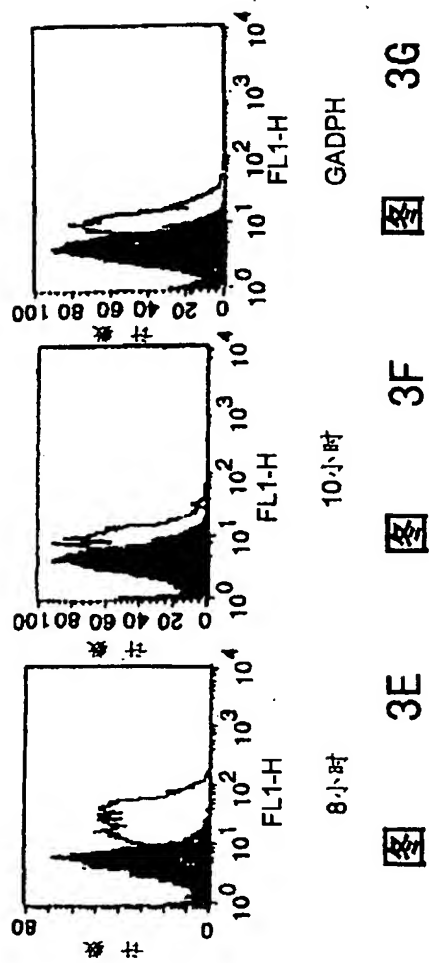
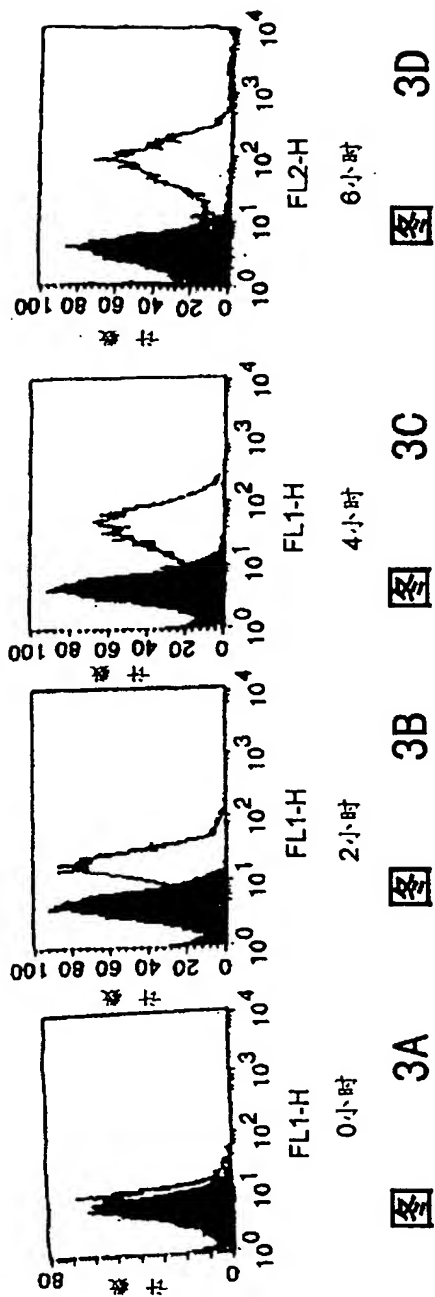
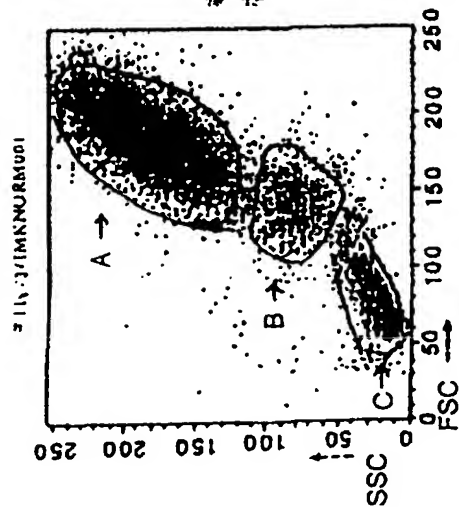


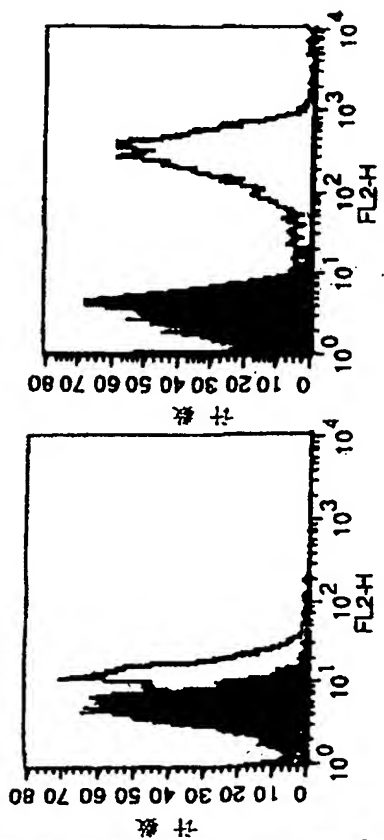
图 2





图

4A

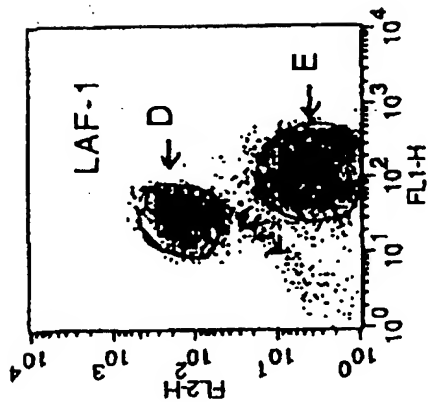


图

4B

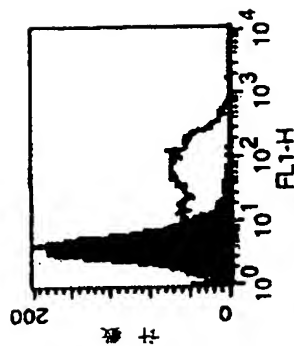
图

4C



图

4D



图

4E